

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 9/28, 1/20, C12P 19/14	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/13792		
		(43) 国際公開日 1994年6月23日 (23.06.94)		
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> (21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平4/329108 1992年12月9日(09. 12. 92) JP (71) 出願人; および (72) 発明者 高崎義幸 (TAKASAKI, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒880 宮崎県宮崎市橘通西1丁目5-30 TIP 806 Miyazaki, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也 (FUJINO, Seiya) 〒102 東京都千代田区麹町5丁目4番 クロスサイト麹町ビル7階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BB, BG, BR, CA, CZ, DK, ES, FI, HU, JP, KR, LK, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 <div style="text-align: right;">国際調査報告書</div> </td> <td style="vertical-align: top; padding-left: 20px;"> PCT/JP93/01791 1993年12月9日(09. 12. 93) </td> </tr> </table>			(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平4/329108 1992年12月9日(09. 12. 92) JP (71) 出願人; および (72) 発明者 高崎義幸 (TAKASAKI, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒880 宮崎県宮崎市橘通西1丁目5-30 TIP 806 Miyazaki, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也 (FUJINO, Seiya) 〒102 東京都千代田区麹町5丁目4番 クロスサイト麹町ビル7階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BB, BG, BR, CA, CZ, DK, ES, FI, HU, JP, KR, LK, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 <div style="text-align: right;">国際調査報告書</div>	PCT/JP93/01791 1993年12月9日(09. 12. 93)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平4/329108 1992年12月9日(09. 12. 92) JP (71) 出願人; および (72) 発明者 高崎義幸 (TAKASAKI, Yoshiyuki) [JP/JP] 〒880 宮崎県宮崎市橘通西1丁目5-30 TIP 806 Miyazaki, (JP) (74) 代理人 弁理士 藤野清也 (FUJINO, Seiya) 〒102 東京都千代田区麹町5丁目4番 クロスサイト麹町ビル7階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BB, BG, BR, CA, CZ, DK, ES, FI, HU, JP, KR, LK, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 <div style="text-align: right;">国際調査報告書</div>	PCT/JP93/01791 1993年12月9日(09. 12. 93)			

(54) Title : NOVEL ACID- AND HEAT-RESISTANT α -AMYLASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND METHOD OF LIQUEFYING STARCH BY USING THE SAME

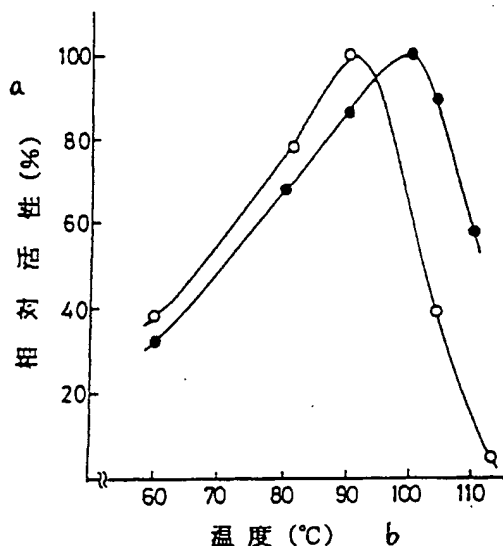
(54) 発明の名称 新規な耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ、その製造法及び該酵素を用いる澱粉の液化法

a ... Relative activity

b ... Temperature

(57) Abstract

A novel α -amylase excellent in acid and heat resistances, which is produced by a microorganism of the genus *Bacillus licheniformis* (α) and is capable of liquefying corn starch under an acidic condition of pH 4.0-5.5 at a temperature of 90-110 °C. Furthermore glucose can be obtained in a high yield by saccharifying corn starch with glycoamylase without adjusting the pH value.



(57) 要約

優れた耐酸性及び耐熱性を有する新規な α -アミラーゼ、この α -アミラーゼの調製方法、この α -アミラーゼを用いて澱粉を液化する方法が開示されている。

バシルス リケニフォルミス α (Bacillus licheniformis α) に属する微生物によって産生される α -アミラーゼは、pH4.0～5.5の酸性条件下及び温度90～110℃の温度下でトウモロコシ澱粉を液化することができる。さらに、トウモロコシ澱粉をpHを調整することなくグリコアミラーゼで糖化させ高収率でグルコースを得ることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストラリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	FI	フィンランド	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GE	イジョージア	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
CA	カナダ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダードトバゴ
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロヴァキア	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ共和国						

明 細 書

新規な耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ、その製造法及び
該酵素を用いる澱粉の液化法

技術分野

本発明は、耐熱性と耐酸性に優れた新規な α -アミラーゼに関する。詳しくはpH4.0～5.5の酸性下、かつ90～110℃以上の高温でトウモロコシ澱粉を液化できる耐酸性と耐熱性に優れた新規な α -アミラーゼ、その製造法及び該酵素を用いる澱粉の分解法に関するものである。

背景技術

澱粉からブドウ糖などのオリゴ糖の製造において、澱粉は、先ず、バシルス属細菌の生産する液化酵素(α -アミラーゼ)により液化され、次いで、アスペルギルス属又はリゾープス属糸状菌の生産するグルコアミラーゼにより糖化することにより製造されている。澱粉の中でも、馬鈴薯澱粉や甘薯澱粉などの地下澱粉は、比較的容易に液化することができるが、現在、主要な原料であるトウモロコシ澱粉は、液化が困難であり、二段液化法(先ず、135℃程度の高温で短時間反応して部分的に液化させるとともに、澱粉を膨潤させ、次いで、 α -アミラーゼを再添加して、約90℃で液化を進行させる方法)と、現在、主流の方法になっているBacillus stearothermophilus (K.Ogasawara, A.Imanishi, T. Isemura, J. Biochem., 67, 65-75 (1970)、遠藤滋俊, 発酵工学雑誌, 37, 353, 356 (1959)), Bacillus licheniformis (F. J. Morganら、J. Applid Bacteriology,

50,107-114(1981), R.L.Antrimら、Starch, 43,355(1991)) あるいは Bacillus subtilis (特公昭58-34117) などのバシルス属細菌の生産する耐熱性 α -アミラーゼを用い、ジェット・クッカー (Jet cooker) と呼ばれる装置で、pH 6 ~ 6.5、103 ~ 110 °C の温度で噴射してのち (約 5 分間滞留)、次いで、90 ~ 95 °C で 1.5 ~ 2 時間保持して液化を進行させる方法により行われている。

しかるに、これまで知られている耐熱性 α -アミラーゼの殆どは最適 pH が 6 ~ 9 にあり、耐酸性に劣るため、澱粉液化時の pH は、これまで、通常、6 ~ 6.5 で行われてきた。一方、グルコースの製造において、液化澱粉の糖化に使用されるアスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼの最適 pH は 4.5 付近、最適温度は 60 °C にあるため、澱粉を、pH 6 ~ 6.5 で液化した後、酸を添加して、pH を 4.5 付近まで低下させ、糖化反応を行うという煩雑な方法が採られている。

また、pH 6 以上の液化では、アルカリ異性化により、生成したデキストリンの還元性末端がフラクトースに異性化され、このため、グルコアミラーゼで糖化したとき、還元性末端側のグルコース 2 残基がマルチュロース (グルコースとフラクトースが α -1,4- 結合したもの) として残存することになり、グルコース収量の低下をもたらしていた (J.K.Shetty, W.G.Allen, Cereal Foods World, 33, 929 (1988))。

以上の理由から、pH 6 以下の酸性下で澱粉を液化する研究が多くの研究者により行われてきた。例えば、後藤京二らは、35 % トウモロコシ澱粉下、pH 6.5 で 105 °C で作用する α -アミラーゼ生産株 Bacillus licheniformis IF012196 株をニトロソグア

ニジンで処理することにより、pH5.5、105℃でも作用する耐酸性 α -アミラーゼ生産変異株を得たと報告している（日本農芸化学昭和61年度大会要旨集653頁）。また、J.F.Shettyらは、最適pHは6.5にあるが、マルチュロースの生成を抑制できるpH5.8においても、トウモロコシ澱粉を液化できるBacillus licheniformis L-170の α -アミラーゼ(Taka-Therm II)について報告している〔Cereal Foods World, 33, 929(1988)〕。また、R.L.Antrimらも最適pHが5.5～6.0にあるBacillus licheniformisの α -アミラーゼを用い、pH5.5での澱粉液化について報告している〔Starch, 43, 355(1991)〕。Nielsenらは、Thermoanaerobacterの生産する耐熱性サイクロデキストリン合成酵素（サイクロデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ）が、pH4.5、105℃でトウモロコシ澱粉を液化できると報告している〔Food Technology, January, 102(1991)〕。また、表1に示しているように、ある種のクロストリジウム属菌も耐酸性の α -アミラーゼを生産することが知られている（特開昭61-115491、特開昭61-185185）が、この酵素は熱安定性に劣っている。

以上のように、これまで酸性下で澱粉を液化するための種々の試みが行われてきているが、現在までに発見されている α -アミラーゼは耐酸性と耐熱性が十分でなく、ジェットクカーを用い、トウモロコシ澱粉が液化できる温度(103～105℃)で、かつpH5以下の酸性下で、商業的にトウモロコシ澱粉を液化することはできなかった。

発明の開示

本発明者らは、グルコアミラーゼによる液化澱粉の糖化と同

じpH領域で、トウモロコシ澱粉を液化できる耐酸・耐熱性の α -アミラーゼを、広く自然界から検索してきた。その結果、バシルス属の1菌株が最適pH約5（1%の可溶性澱粉の下、80℃で30分反応のときpH4.7～5.3）、最適温度90℃（1%可溶性澱粉の下で10分反応。5mMの塩化カルシウムの存在下では、最適温度は約100℃）にあり、30～35%のトウモロコシ澱粉の下、pH4.0～5.5、好ましくは4.5～5.0の酸性下、かつ90～110℃、好ましくは105～110℃の高温でトウモロコシ澱粉を液化できる耐酸性と耐熱性に優れた新規な α -アミラーゼを菌体外に生産することを見出して本発明に到達した。

即ち、本発明の目的は、pH4.0～5.5の酸性下、かつ90～110℃以上の高温で、トウモロコシ澱粉を液化できる新規な α -アミラーゼを提供するものである。

本発明の他の目的は、耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ生産能を有するバシルス・リケニフォルミスを培養して、該 α -アミラーゼを生産し、これを採取するバシルス属耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの製造方法を提供することにある。

更に、本発明の他の目的は、この酵素を用いて澱粉を液化する方法を提供することにある。

本発明の耐酸・耐熱性 α -アミラーゼは、例えばバシルス属に属する菌株を培養することにより得られる。

本発明の耐酸・耐熱性 α -アミラーゼの理化学的性質は下記に示す通りである。

- a) 作用及び基質特異性：澱粉の α -1,4-グルコシド結合をエンド型で分解し、デキストリン化する。このため、澱粉の粘度は急激に低下し液化する。反応初期にはG₅（グルコース5個

からなるマルトペンタオース) と G。(グルコース 6 個からなるマルトヘキサオース)などを生成するが、最終的には、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースなど一連の還元性オリゴ糖を生成する。本酵素はアミロペクチン又はその派生物の α -1,6- グルコシド結合を加水分解することはできない。

b) 作用 pH 及び最適 pH: 本酵素は pH3.5 ~ 10 の広い範囲に作用する。表 3 (後記する実施例 2) に示すように、5mM 酢酸緩衝液 1% 可溶性澱粉の下で、80℃ で 30 分間反応したとき、最適作用 pH は 4.7 ~ 5.3 にあり、pH5.5 以下の酸性下においてもよく作用する(第 1 図参照、—○—酢酸緩衝液、—●—リン酸緩衝液)。また、後記する実施例 5 から明らかなように、実質的な澱粉液化条件である 30% の澱粉下、かつ 5mM の CaCl_2 の存在下で、一次液化を 105℃ で 5 分、二次液化を 95℃ で 0.5 ~ 6 時間行ったときの最適 pH は約 5 に認められる(第 4 図参照、—□—pH5.25、—■—pH5.0、—○—pH4.75、—●—pH4.5)。pH4.5 前後においてもよく作用し、トウモロコシ澱粉を完全に液化できる。

c) 作用温度及び最適温度: 本酵素は約 120℃ まで作用する。表 4 (後記する実施例 3) に見られるように、1% 可溶性澱粉を基質とし、10mM 酢酸緩衝液(pH5.5) で 10 分間反応させたときの最適温度は約 90℃ に認められるが(第 2 図参照、—○—)、5mM の CaCl_2 の存在下では約 100℃ に認められた(第 2 図参照、—●—)。実用的な澱粉液化条件である 30% の澱粉下、かつカルシウムイオンの存在下では、pH 4 ~ 5.5、好ましくは 4.3 ~ 5、温度 90 ~ 120℃、好ましくは 90 ~ 105℃ で澱粉を液化すること

ができる (表 6) (図 5 参照、—■— 105℃、—□— 100℃、—●—95℃、—○— 100℃)。

d) pH安定性: 50℃、1時間の処理で、pH約5~10において安定である。pH約4.5~11で80%以上の活性が保持される。

e) 熱安定性: 5mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) の下、60~100℃の温度で10分間加熱したとき、90℃まで失活が認められない (第3図参照、—○—)。加熱した後の残存活性を表5 (実施例4) に示したように、100℃で、10分間の加熱で約50%の失活が認められるが、基質及びCaCl₂の存在下で安定化される。例えば、5mMのCaCl₂の存在下では100℃で10分加熱しても失活が認められず (第3図参照、—●—)、また30分加熱後も殆ど失活が認められない。澱粉の液化条件である30~35%の澱粉下、かつCaCl₂の存在下では、100℃で2時間反応させても、活性の低下は殆ど認められない (第5図参照)。

f) 分子量: セファデックスG-75を用いたゲル濾過法により測定した分子量は約9,000である。本酵素はアミコン社製造の分子量1万以上を阻止する限外濾過膜 (YM-10) を通過し、分子量は3千以下を阻止する限外濾過膜 (YM-3) で阻止される。

g) 安定化: Ca²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺、Na⁺などの存在下で熱失活から保護される。h) 阻害剤: Zn²⁺、Hg²⁺、Ag²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、

Al³⁺などにより阻害される。i) 精製法: 培養液上澄から、80%硫酸沈殿、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーとセファデックスG-75カラムクロマトグラフィーなどにより電気泳動的に均一まで精製することができる。

本発明の α -アミラーゼの酵素活性は次のようにして測定した。

(a) ヨウ素法（糊精化力）：0.1M酢酸緩衝液に溶解した1%可溶性澱粉液(pH5.0)0.5 mlに該酵素溶液の適量を加え、蒸溜水で全量 1.0 mlとし、90℃で反応させる。15分間反応後、ヨウ素溶液〔ヨウ素液(0.2 g I₂ + 2g KI) 2.5 mlと0.1M HCl10 mlを100 mlとしたもの〕5 mlを加えて反応を停止させると共に、ヨウ素呈色し、15分放置後、660nm で比色する。この条件で、1 分間に1 %の青色を褪色する酵素量を1 単位とする。

(b) 粘度法（糊精化力）：JIS-7001-1990 に準じて行った。すなわち、ポテト澱粉1gを含む0.1M酢酸緩衝液(pH5.0) 10 mlに、酵素液を1 ml加え、65℃で反応する。粘度比較液として、シリコン油（ジメチルポリシロキサン）を用い、15分間で同じ粘度とする酵素量を1 単位とする。

(c) 還元糖定量法（糖化力）：0.1M酢酸緩衝液に溶解した1%可溶性澱粉液(pH5.0)0.5 mlに該酵素水溶液の適量を加え、蒸溜水で全量 1.0 mlとし、90℃で反応させ、生成した還元糖をソモギー・ネルソン法により定量する。この条件で1 分間に1 マイクロモルのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1 単位とする。

以上の本発明の α -アミラーゼの酵素的性質について、公知の α -アミラーゼのと比較したものを表1及び表2に示す。

表 1

各種耐熱性 α -アミラーゼの比較 (その1)

菌 株	本発明の酵素	<u>B.stearoth-</u> <u>ermophilus</u>	<u>B.licheni-</u> <u>formis</u>	<u>B.subtilis</u> <u>MN-3851</u>	<u>B.subtilis</u>
最適pH	約4.7~5.3 1%澱粉下, 80℃で30 分)	5~6 ¹⁾ (60℃, 10 分) 4.6~5.1 65℃, 10 分)	7~9 ¹⁾ 5~6 ²⁾ (50℃, 1mM Ca ²⁺)	6~7 (1% 澱粉, 40 ℃, 90℃	6~8
安定pH	5~10 (50℃, 1hr)	6~11 26℃, 30min)	7~11 ¹⁾ 6~11 ²⁾ (25℃, 30min)	5~11 (50℃, 1hr)	5~11
最適温度	約90℃ (1%澱粉下, pH 5, 10 分) Ca ²⁺ 存在下 で約100℃	65~73℃ ¹⁾ (10 分) 55~70℃ ²⁾	90℃ ¹⁾ 76℃ ²⁾ (pH9.0, 10分)	95~98℃ (pH6, Ca ²⁺ 存在下)	70℃ (1.3% 澱粉下) 85~90℃ (35%澱粉, Ca ²⁺ 存在下)
熱安定性	pH5.5, 90℃, 10分で失活し ない。100℃, 10分で約50% 失活。 Ca ²⁺ の存在下 では, 100℃, 30分加熱して も失活しない。	pH6, 90℃, 6 分 で17% 失活 ¹⁾ 85℃, 20hr で 29% 失活 ²⁾	pH8.0, 60℃ 以下で安定 ²⁾	pH8, Ca ²⁺ と澱 粉の下, 90℃, 30min で殆ど 失活しない (Ca ²⁺ 存在し ないときpH8, 80℃, 30分で 約85% 失活す る。	70℃以下 で安定
安定化	Ca ²⁺ , Na ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺
阻害剤	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Al ³⁺			Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺	EDTA, Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺
分子量	約9,000 ^{a)}	48,000 ^{1) b)}	62,500 ¹⁾ 22,500 ^{2) a)}	30,000 ^{c)}	49,000
文 献		¹⁾ K.Ogasawara, J.Biol.Chem. 67, 65 (1970) ²⁾ J.Biochem, 236, 2952 (1961)	¹⁾ F.J.Morgan J.App.Bact., 50, 107 (1981) ²⁾ N.Saito, Arch.Biochem. Biophys., 155, 290, (1973)	服部文雄, 特公昭58- 34117	J.Biochem., 67, 65 (1970)

測定法: a) ゲル濾過法, b) 沈降法, c) SDS アクリルアミド電気泳動法

表 2

各種耐熱性 α -アミラーゼの比較 (その2)

菌 株	<u>B.amylolique-</u> <u>faciens</u>	<u>Thermophile</u> <u>V-2</u>	<u>B.acido-</u> <u>caldarius</u>	<u>Clostridium</u> <u>sp.</u>
最適pH		6~7	3.5	5.5(80℃) ¹⁾ 約4.5(60℃) ²⁾
安定pH		9.2	4~5.5	2 ~ 7 ²⁾ 60℃, 30min)
最適温度	80 ℃ (35%澱粉下)	70 ℃	70 ℃	80℃ (pH4, Ca ²⁺) ¹⁾ 90℃ (pH6, Ca ²⁺) ²⁾
熱安定性				80℃, 30min で70% 保持 ¹⁾ (1mM Ca ²⁺)
安定化	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺
阻害剤				Ni ²⁺ , Cu ²⁺ Zn ²⁺ , Mn ²⁺ ¹⁾ Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺
分子量		50,000	66,000	72,000±3,000 ^{c)} 20,000以上 ^{2) d)}
文 献	T.Kotaka, J.Jap.Soc. Starch Sci., 27,151 (1980)	A.Hasegawa, J.Biochem., 29,35 (1976)	M.Kanno, Agric.Biol. Chem., 51, 23 (1986)	1)特開昭61-185185 2)特開昭61-115491

測定法: c) SDS アクリルアミド電気泳動法、d) 分子篩法

表 1 及び表 2 から明らかなように、本発明の酵素の特徴の 1 つは、公知の α -アミラーゼよりも耐酸性と耐熱性に優れていることである。本発明の酵素は実用的な澱粉濃度である 30~35 %の澱粉濃度の下、かつカルシウムイオンの存在下では、pH 約 5 の酸性下で最適温度は 95~100 ℃にあり、また、Ca²⁺の存在下では、100 ℃で 10 分加熱しても活性の低下が殆ど認められない(表 5)(第 3 図)。pH 4.5~5.25 の酸性下で、90、95 又は 100 ℃で 2 時間反応後も活性の低下が殆ど認められない(表 7)(第

5 図)。従って、本発明の酵素を使用すれば、トウモロコシ澱粉の液化に必要な、100 ～110 ℃の高温下の液化を、pH 4 ～5 の酸性下で行うことができる。これに対し、これまでに知られている α -アミラーゼの殆どは、pH 6 ～7 では比較的安定であるが、pH 6以下の酸性側で不安定であり、103～110 ℃の温度では、pH5.5以下でトウモロコシ澱粉を液化することは実質上できなかった。

本発明の酵素のもう1つの大きな特徴はこれまで知られている α -アミラーゼに比べ、分子量が極めて小さいことである。すなわち、表1及び表2から明らかなように、これまでに報告されている α -アミラーゼの分子量は2万～7万にあるのに対し、本発明の酵素は、分子量3000以下を通過させる限外濾過膜(Amicon社製造、YM-3)で阻止されたが、分子量1万以下を通過させる限外濾過膜(Amicon社製造、YM-10)を通過した。セファデックス(Sephadex)G-75を用い、また、標準タンパク質としてリボヌクレアーゼ(分子量13,700)、キモトリプシン(分子量35,000)、オボアルブミン(分子量45,000)、血清アルブミン(分子量67,000)を用い、ゲル濾過法により推定した本酵素の分子量は約9000ダルトンであった。すなわち、本発明の酵素はこれまでに知られていない極めて小さい分子量の酵素であるといえる。このように分子量が極めて小さいことが、本発明の酵素の耐酸性と耐熱性に寄与しているものと考えられる。

更に、本発明の酵素を用いることにより、トウモロコシ澱粉をpH5以下で液化することができ、トウモロコシ澱粉に含まれるタンパク質などの不純物がデキストリンときれいに分離できるようになり、極めて濾過性が優れた澱粉液化物(デキストリ

ン)を得ることができることにある。また、得られたデキストリンは極めて老化しにくいものである。このような優れたデキストリンは、本発明の耐酸性かつ耐熱性の酵素を用いることにより初めて得られたものである。本発明の α -アミラーゼの酵素作用様式が、従来の α -アミラーゼとは微妙に異なっていることによるものと考えられる。

耐酸・耐熱性 α -アミラーゼ生産菌*B. lichemiformis* α は、宮崎県宮崎郡清武町の畑地、深さ約5 cmの土壌より分離した。すなわち、該土壌の少量を殺菌水に懸濁し、上澄を、可溶性澱粉 2%、ポリペプトン 1%、 K_2HPO_4 0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、寒天 2.5%からなる組成の plate培地に塗布し、30℃で生育してきた約8000株の細菌の中から本菌を選択した。

その菌学的的性質は下記の通りである。なお本菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に微工研菌寄第 13286号 (FERM P-13286)として寄託され、後にブタペスト条約による、同所国際受託番号FERM BP-4480として寄託がなされている。

- (1) 形態： 桿菌
- (2) グラム染色性： +
- (3) 運動性： +
- (4) 芽胞：
 - 孢子囊： 非膨出
 - 形： 橢円形
 - 位置： 中立～亜端立
- (5) カタラーゼ： +
- (6) 嫌気下での生育： +
- (7) V-P反応： +

- (8) V-PブロスのpH: 5.3
- (9) グルコースからの酸の産生: +
- (10) グルコースよりガスの生成: -
- (11) ゼラチンの液化: +
- (12) 澱粉の分解: +
- (13) クエン酸の利用: +
- (14) プロピオン酸塩の利用: +
- (15) 卵黄反応: -
- (16) 硝酸塩の還元: +
- (17) pH6.8での生育(ニュートリエントブロス): +
- (18) pH5.7での生育: +
- (19) 5%NaCl存在下での生育: +
- (20) 7%NaCl存在下での生育: +
- (21) 10℃での生育: -
- (22) 30℃での生育: +
- (23) 55℃での生育: +
- (24) 65℃での生育: -

+は“する”または陽性を示し、-は“しない”または陰性を示す。

以上の菌学的性質について、Bergey's Mannual of Determinative Bactgeriology, 第7版及び第8版を参照し、本菌をバシルス・リケニフォルミス(Bacillus licheniformis)に近縁の微生物と同定し、本菌をバシルス・リケニフォルミス α (Bacillus licheniformis α) と命名した。

バシルス・リケニフォルミスは、表1に示すように、最適温度が70℃にある、比較的熱に安定な α -アミラーゼと最適温度

が90℃にある熱に安定な α -アミラーゼを生産することが知られているが、最適温度が90℃にある α -アミラーゼの最適pHは7～9にあって、本発明の α -アミラーゼと異なっている。

本菌を培養して本発明の α -アミラーゼを生産するには、窒素源として、大豆粕、大豆タンパク、コーン・ステープ・リカー、肉エキス、ペプトン、ミルクカゼイン、酵母エキスなどの有機窒素源が使用される。中でも、ポリペプトン、ポリペプトンS酵母エキス、大豆タンパク、コーン・ステープ・リカーなどは良好な窒素源である。この他、必要に応じ、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウムなどの無機窒素源が使用される。炭素源としては、通常、澱粉又は液化澱粉、可溶性澱粉、デキストリンなどの澱粉派生物が使用される。

以上の窒素源と炭素源の他に、リン酸塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などが補足原料として使用される。特に、リン酸塩、マグネシウムイオン、マンガンイオンなどの添加は効果があり、リン酸塩として、例えば、 K_2HPO_4 は0.05～0.3%、マグネシウム塩として、例えば、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ は0.01～0.3%、カルシウム塩として、例えば、 $CaCl_2$ は0.01～0.1%程度添加される。

本発明の α -アミラーゼは菌体外に生産される。培養後、濾過又は遠心分離により、除菌し、酵素を回収する。

本発明の α -アミラーゼは耐酸性と耐熱性に優れているため、現在、工業的に使用されているバシルス・スブチルス(*Bacillus subtilis*)やバシルス・リケニオルミス(*Bacillus licheniformis*)などのバシルス属菌の生産する耐熱性 α -アミラーゼと同様に

100～110℃の高温でトウモロコシ澱粉を液化するのに使用することができる。しかし、本発明の α -アミラーゼが従来の α -アミラーゼと異なるところは、本発明の酵素がpH4.5前後の酸性下で使用できることにある。このため、澱粉乳のpHを、無調整又はpH4.0～5.0に調整して液化後、pHを再調整することなく、そのまま、アスペルギルス属菌の生産するグルコアミラーゼにより糖化することができる。具体的には、30～35%のトウモロコシ澱粉乳に本発明の酵素の適当量を加え、ジェットクーラーを用いて、103～105℃で5分程度処理し、次いで、90～95℃で0.5～数時間程度処理することにより、糖化に使用できるDE10前後の液化澱粉を製造することができる。

澱粉液化において、カルシウム塩として、例えば塩化カルシウムを1～10mM程度添加される。100℃以上の温度で、かつpH5以下での澱粉液化においてはカルシウム塩の陰イオン成分は酵素の安定性に著しく影響する。カルシウム塩としては、炭酸カルシウム、生石灰などがカルシウム源として使用される。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の α -アミラーゼの最適pHを示す図である。—○—は酢酸緩衝液を使用した場合を示し、—●—はリン酸緩衝液(KH_2PO_4 - NaHPO_4)を使用した場合を示す。

第2図は、本発明の α -アミラーゼの最適温度を示す図である。

—○—は、 CaCl_2 無添加の場合を示し、—●—は5mM CaCl_2 が存在した場合を示す。

第3図は、本発明の α -アミラーゼの熱安定性を示す図であ

る。pH約5.5で、90℃、95℃、100℃で10分間加熱した後の残存活性を示す。—○—は、CaCl₂ 無添加の場合を示し、—●—は5mM CaCl₂ の存在下で加熱した場合を示す。

第4図は、本発明のα-アミラーゼを用いて約35%トウモロコシ澱粉、8mM 酢酸緩衝液、5mM CaCl₂ の下、一次液化を105℃で5分行ったのち、90℃で2次液化を行った結果を示す図である。

—●—はpH4.5、—○—はpH4.7、—□—はpH5.0、—■—はpH5.5の酢酸緩衝液による一次液化を示す。

第5図は、本発明のα-アミラーゼを用いて約30%のポテト澱粉、8mM 酢酸緩衝液(pH5.5)、5mM CaCl₂ の下で、液化を行った図を示す。

—○—は液化温度90℃、—●—は95℃、—□—は100℃、—■—は105℃をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明の内容を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

大豆粕 2%、可溶性澱粉 2%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、K₂HPO₄ 0.2%、CaCl₂·2H₂O 0.05%からなる培地(pH5.5)200mlを1リットル容三角フラスコに入れ、121℃で15分殺菌後、バシルス・リケニフォルミス α (FERM BP-4480)を接種し、30℃、225回転/分で5日間培養した。その結果、培地1ml当たり、1.5単位生産された。

培養液を遠心分離して、上澄液を得、硫酸アンモニウムを80%飽和になるよう加え、生成した沈殿を回収後、透析し、アミ

コン社製、YM-3で限外濾過により濃縮し、31.8単位（粘度法）/
mlの酵素液を得た。

実施例 2

実施例 1 で得られた本発明の α -アミラーゼを、1 %可溶性
澱粉、0.1M緩衝液下で30分間反応させて、本発明の α -アミラ
ーゼの活性のpH依存性を調べた。なお、緩衝液としては、酢酸
緩衝液およびリン酸緩衝液 (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) を用いた。結果
を表 3 及び第 1 図に示した。

表 3

p H	Relative activity 相対活性 (%)	緩衝液
3.6	8.0	酢酸緩衝液
4.2	34.0	"
4.5	98.0	"
4.7	100	"
5.0	100	"
5.9	87.0	"
6.2	86.0	リン酸緩衝液
8.1	44.0	"
8.4	37.0	"
8.7	27.0	"

この表 3 から明かなように、本発明のアミラーゼは、pH 4 ~
8.5 において活性を有し、特にpH4.5 ~5.5 において活性は極
めて高い。

実施例 3

実施例 1 で得られた本発明の α -アミラーゼを、1 %可溶性
澱粉、10mM緩衝液 (pH 5.5) 下で10分間反応させて、本発明の
 α -アミラーゼの活性の温度依存性を、 CaCl_2 無添加の場合と、
5mM CaCl_2 が存在する場合について調べた。結果を表 4 及び第
2 図に示した。

表 4 温度による相対活性

温 度	CaCl ₂ 無添加	5mM CaCl ₂ 添加
60℃	48.5 %	33 %
70	55	48
80	77	68
90	100	86
100	62	100
104	47	99
113	5	58

この表 4 から明かなように、本発明の α -アミラーゼは、90℃で高い活性を有する。また、カルシウムイオンを存在させるときは90～104℃で高い活性を有し、高温で反応させることができる。

実施例 4

実施例 1 で得られた本発明の α -アミラーゼを、5mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) 中で60～100℃で10分間加熱した後の残存活性を調べた。結果を表 5 及び第 3 図に示した。

90℃までの加熱では失活は認められない。100℃、の加熱では50%の失活が認められたが、カルシウムイオンを存在させたときは失活は認められず、30分間加熱しても殆ど失活は認められなかった。

表 5 熱安定性試験

加熱温度 (℃)	Relative Activity (%)	
	CaCl ₂ 無添加	CaCl ₂ 5mM 添加
60	100	100
70	100	100
80	100	100
90	100	100
100	52	100

実施例 5

実施例 1 で得られた本発明の α -アミラーゼを、約 35% トウモロコシ澱粉、8mM 酢酸緩衝液、5mM CaCl_2 の下、一次液化を 105℃ で 5 分行った後、90℃ で二次液化を行った。結果を表 6 及び第 4 図に示した。

表 6

初発 pH	最終 pH	Dextrose Equivalent					
		0.5	1.0	1.5	2.0	6.0	(hrs)
4.50	4.27	0.9	1.4	1.5	1.8	3.2	
4.70	4.58	1.4	2.5	3.8	4.9	10.2	
5.02	4.97	2.1	3.7	5.5	6.8	14.2	
5.25	5.27	1.8	3.1	4.5	6.0	14.5	

実施例 6

実施例 1 で得られた本発明の α -アミラーゼを用い、澱粉の液化条件を検討した。

ポテト澱粉 0.4 g、0.4M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 0.2 ml、0.1M CaCl_2 0.05 ml、実施例 1 で調製した α -アミラーゼ 1.6 単位 (粘度法) を加え、全量 1.0 ml とし、90℃、95℃、100℃ 及び 105℃ で反応を行った。

経時的に、1 定量採取し、生成した還元糖をソモギー・ネルソン法により、グルコースとして定量した。得られた結果を表 7 及び第 5 図に示す。

表 7 澱粉の液化における温度の影響

温 度 (℃)	反 応 時 間 (分)	還元糖 (グルコースとして) (mg/ml)
90	30	2.78
	60	5.90
	90	9.30
	120	12.40
95	30	3.11
	60	6.85
	90	9.14
	120	12.60
100	30	3.19
	60	7.80
	90	9.80
	120	13.00
105	30	2.44
	60	5.22
	90	7.31
	120	9.20

実施例 7

本実施例においては、澱粉液化のpHの影響について試験した。実施例 1 で調製した酵素3.2 単位に、ポテト澱粉0.4 g、0.4mM 酢酸緩衝液 (pH4.5 - 5.25)0.2ml、0.1M CaCl₂, 0.05mlを加え、全量1.0 mlとし、初発pH4.5、4.75、5.0、および5.25で、90℃で、30分、60分、90分及び 120分間反応を行った。生成した還元糖をソモギー・ネルソン法により定量した。得られた結果を表 8 に示す。

表 8 ポテト澱粉液化におけるpHの影響(反応温度90℃)

反応時間 (分)	還元糖生成量 (グルコースとして) mg/ ml			
	pH 4.5	pH 4.75	pH 5.0	pH 5.25
30	1.01	1.93	2.62	2.61
60	1.95	3.92	5.66	5.53
90	2.80	6.05	8.40	9.56
120	3.73	8.79	10.80	11.70

表 8 から明らかなように、高濃度の澱粉下、90℃の反応において、60分までの反応において最適pHは5付近に認められた。しかし、還元糖生成量から明らかなようにいずれのpHにおいても、120分反応後も活性の大きな低下は認められなかった。

実施例 8

本実施例においては、トウモロコシ澱粉の液化について試験した結果を示す。ネジ付き試験管に、実施例 1 で調製した酵素 3.2 単位 (いずれも粘度法) に、トウモロコシ澱粉 0.4g、0.4M 酢酸緩衝液 (pH4.5、4.75、5.0 および 5.25) 0.2ml、0.1M CaCl_2 0.1 ml を加え、全量 1.0 ml とし、105℃で5分間油槽で加熱液化 (一次液化) し、次いで、95℃と90℃で6時間液化を続けた。0.5、1.0、1.5、2.0 とおよび 6 時間目に一定量を採取し、生成した還元糖をソモギー・ネルソン法により定量し、DE を求めた。得られた結果を表 8 に示す。ここで、DE (Dextrose Equivalent の略、ブドウ糖当量) は固形分中の還元糖量をグルコースとして表した百分率である。

表 9 トウモロコシ澱粉の液化(1)

一次液化	二次液化	D E			
		pH 4.50	pH 4.70	pH 5.02	pH 5.25
105℃, 5分	95℃, 0 時間	0.48	0.65	0.94	0.73
	0.5	0.91	1.38	1.95	1.72
	1.0	1.37	2.45	3.64	3.07
	1.5	1.52	3.76	5.48	4.62
	2.0	1.76	4.92	6.73	6.01
	6.0	3.23	10.20	14.20	14.5
2時間反応後のpH		4.27	4.58	4.97	5.27

表 10 トウモロコシ澱粉の液化(2)

一次液化	二次液化	D E			
		pH 4.50	pH 4.75	pH 5.02	pH 5.25
105℃, 5分	90℃, 0.5時間	0.57	1.34	2.20	2.41
	1.0	1.15	2.40	3.72	4.29
	1.5	1.67	3.60	4.97	5.95
	2.0	2.25	4.46	6.88	7.17
	6.0	6.40	11.30	13.88	17.47
2時間反応後のpH		4.49	4.77	4.97	5.27

表 9 及び表 10 から明らかなように、本発明の酵素は、pH 約 4.5～5 の酸性下でも、従来の α -アミラーゼと同様の液化条件（一次液化：105℃，5 分、二次液化：90～95℃）で澱粉を効果的に液化することができた。

実施例 8

本実施例においては、酵素量を変えてトウモロコシ澱粉を液化した結果について記す。

トウモロコシ澱粉 0.4 g、0.4M 酢酸緩衝液 (pH 4.5 又は 4.75)

0.2 ml、0.1M CaCl₂ 0.1 mlに、実施例1で調製した酵素を、澱粉 g 当たり表11記載の量加え、全量1.0 mlとし、一次液化を105℃で5分行ったのち、90℃で6時間反応を継続した。経時的に一定量を採り、生成糖をソモギー・ネルソン法により測定し、DEを求めた。

得られて結果を表11に示す。

表 11 トウモロコシ澱粉の液化(3)

反 応 時 間 (時)	pH 4.5				pH4.75	
	9.0 単位	13.5単位	18.0単位	22.5単位	8.0 単位	16.0単位
0.5	2.3	2.7	3.3	3.8	1.3	3.1
1.0	2.8	3.3	4.1	4.9	2.4	5.5
2.0	3.7	4.8	6.7	7.7	4.5	9.0
6.0	7.5	10.6	13.0	14.4	11.3	17.5

表11から明らかなように、酵素量を増加することにより、DEは増加し、pH4.5又はpH4.75の酸性下でも、グルコアミラーゼの糖化に必要なDE 10 前後の液化澱粉を得ることができた。また、得られた液化物は、トウモロコシ澱粉中に含まれているタンパク質等の不純物が浮遊物として分離し、極めて濾過性が優れている。得られたデキストリンは老化しにくいものであった。

実施例 9

実施例8に従い、pH4.5で液化したトウモロコシ澱粉の液化液(DE 18)を原料としてアスベルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ(デンマーク ノボ社製造)で糖化を行った。

液化澱粉約30%、8mM 酢酸緩衝液(pH4.5)、グルコアミラーゼ(6.1単位/g基質)、プルラナーゼ(0.5単位/g基質)の存在下、又は非存在下で、60℃で25時間反応した。糖化液の糖組成は高

速液体クロマトグラフィーによった。得られた結果を表12に示す。

表 12 pH4.5で液化したトウモロコシ澱粉の糖化液の糖組成

酵 素	16 時間			20 時間			25 時間		
	G ₁	G ₂	G ₃ ~	G ₁	G ₂	G ₃ ~	G ₁	G ₂	G ₃ ~
グルコアミラーゼ	94.8	1.7	3.5	95.3	2.5	2.2	95.3	2.6	2.1
グルコアミラーゼ + プルラーゼ	97.5	1.6	0.9	97.4	1.8	0.8	97.4	1.8	1.1

グルコアミラーゼ単独で糖化した場合、約95.3%の高い収量でグルコースが得られた。また、プルラーゼの存在下でグルコアミラーゼで糖化した場合、97.5%の高い収量でグルコースが得られた。すなわち、本発明の α -アミラーゼを使用し、pH 5以下の低いpHで液化した液化澱粉を使用した場合、二糖類(G₂)成分の少ない糖化液が得られる傾向が認められた。

ここで、グルコアミラーゼ1単位とは、1%可溶性澱粉の下(5mM 酢酸緩衝液含む)、pH5.0、40℃で反応し、1分間に1マイクロモルのグルコースを生成する酵素量である。

また、プルラーゼ1単位とは、1%プルランの下(5mM 酢酸緩衝液を含む)、pH5.0、50℃で反応し、1分間に1マイクロモルのグルコースに相当する還元力を生成する酵素量である。

本発明のバシルス属の菌株より得られる α -アミラーゼは耐酸性と耐熱性に優れており、pH 5以下の酸性下で、105℃と90～95℃でトウモロコシ澱粉を液化し、pHを調整することなく、

グルコアミラーゼによる糖化原料として使用することができる。
また、本発明の α -アミラーゼを用いることにより、老化しにくい優れたデキストリンを生成させることができる。

産業上の利用可能性

本発明のバシルス属の菌株より得られる α -アミラーゼは耐酸性と耐熱性に優れており、pH 5 以下の酸性下で一次液化 105℃と二次液化90～95℃でトウモロコシ澱粉を液化し、pHを調整することなく、グルコアミラーゼによる糖化原料として使用することができる。

微生物への言及

1 Bacillus licheniformis α

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

受託番号：FERM BP-4480

(平成4年11月16日に寄託された微工研菌寄第 P-13286号より移管)

請 求 の 範 囲

1. バシルス属に属する菌株が産生する、最適pHが5.5以下であり、かつ最適温度が90℃以上である、耐酸性及び耐熱性を有する α -アミラーゼ。

2. バシルス属に属する菌株がBacillus licheniformisに属する菌株である請求の範囲1の α -アミラーゼ。

3. バシルス属に属する菌株がBacillus licheniformis α (FERM BP-4480)である請求の範囲1の α -アミラーゼ。

4. 次の理化学的性質をもつ請求の範囲1の α -アミラーゼ。

1) 作用及び基質特異性：

澱粉の α -1, 4-グルコシド結合をエンド型で分解して澱粉をデキストリン化する。

アミロペクチンあるいはその派生物の α -1, 6-グルコシド結合を加水分解できない。

2) 作用pH及び最適pH：

作用pH 3.5～10 (1%可溶性澱粉及び5mM酢酸緩衝液下で80℃で測定)

最適pH 5 (1%可溶性澱粉及び5mM酢酸緩衝液下で80℃で測定)

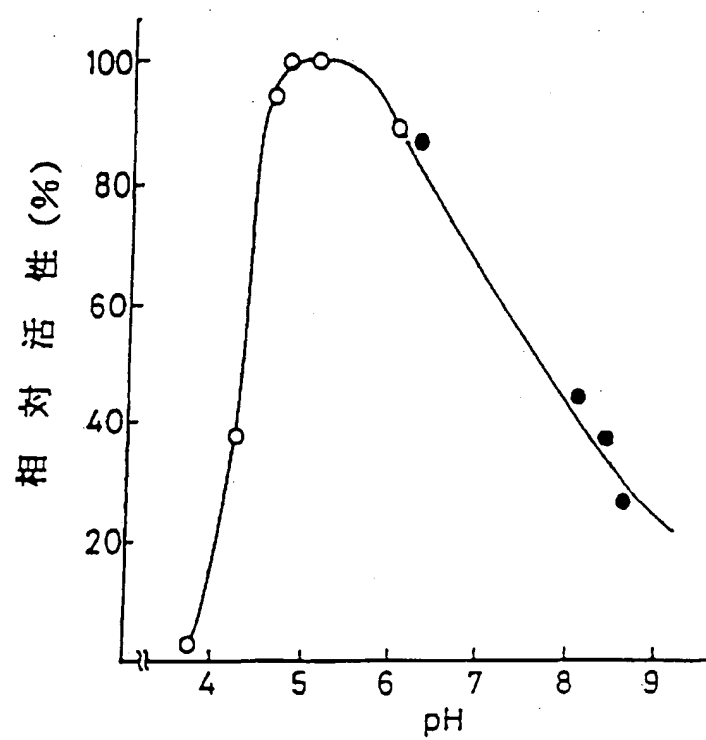
3) 作用温度及び最適温度：

作用温度の上限 120℃

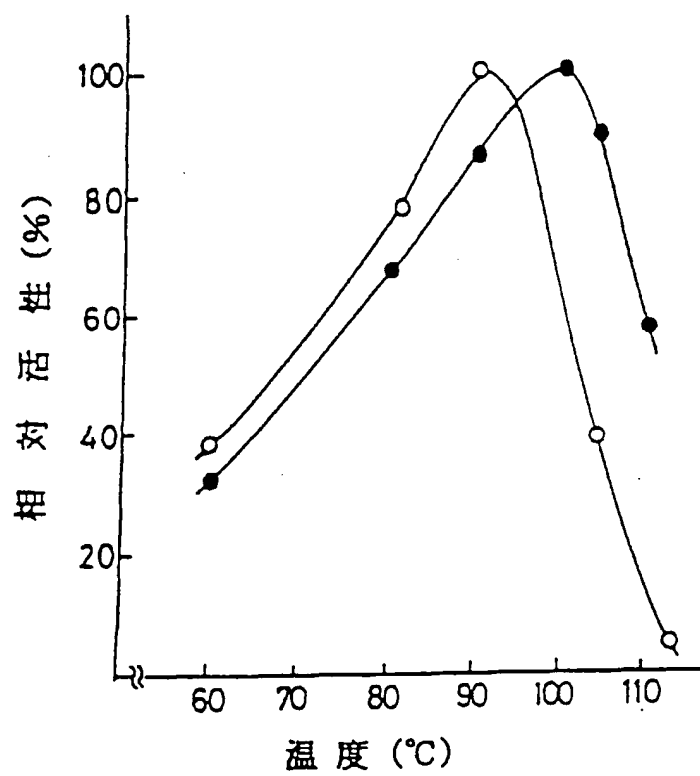
最適温度 90℃ (1%可溶性澱粉及び5mM酢酸緩衝液 (pH5.5) 下で測定)

100℃ (5mM カルシウムイオンの存在下、1%可溶性澱粉及び5mM酢酸緩衝液 (pH5.5) 下で測定)

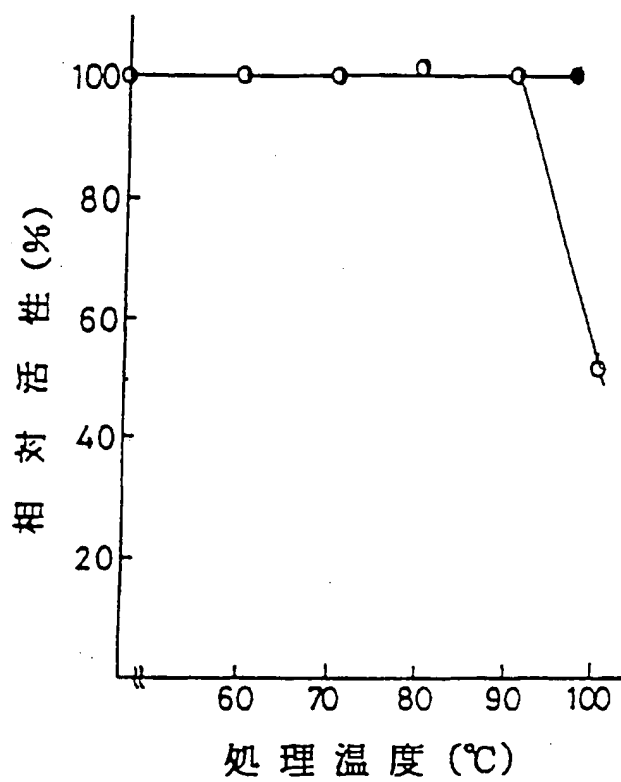
- 4) pH安定性：
pH5～10で安定（0.1M酢酸緩衝液あるいは0.1Mリン酸緩衝液中で50℃で1時間処理した場合）
- 5) 熱安定性：
90℃まで安定で、100℃では50％が失活（pH5.5の5mM酢酸緩衝液で加熱した場合）
5mMカルシウムイオンの存在下で100℃で10分間加熱しても失活しない。
- 6) 分子量：約9000ダルトン（ゲル濾過法による）
- 7) 安定化： Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 又は Na^{+} の存在下で熱失活から保護される。
- 8) 阻害剤： Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 又は Al^{3+} の存在により活性が阻害される。
5. *Bacillus*属に属する、請求の範囲1記載の耐酸・耐熱性 α -アミラーゼを産生することのできる微生物。
6. 請求の範囲5に記載される微生物が*Bacillus licheniformis*に属する菌株である微生物。
7. *Bacillus licheniformis* α (FERM BP-4480)
8. *Bacillus*属に属し、請求の範囲1記載の α -アミラーゼを産生する微生物を培養し、培養液から請求の範囲1記載の α -アミラーゼを採取することを特徴とする耐酸性及び耐熱性を有する α -アミラーゼの製造法。
9. 澱粉に請求の範囲1記載の α -アミラーゼを温度90℃以上、pH5.5以下で作用させ澱粉を加水分解することを特徴とするデキストリンの製造法。



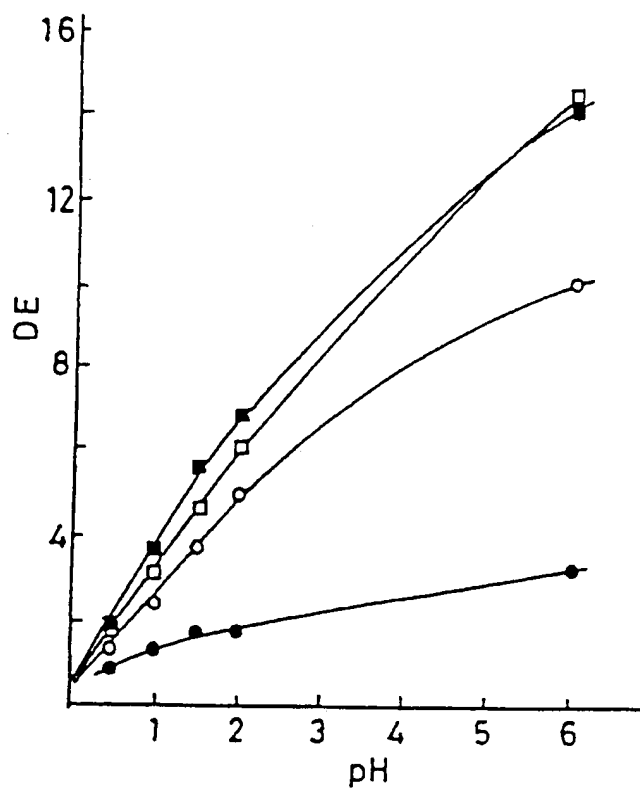
第 1 图



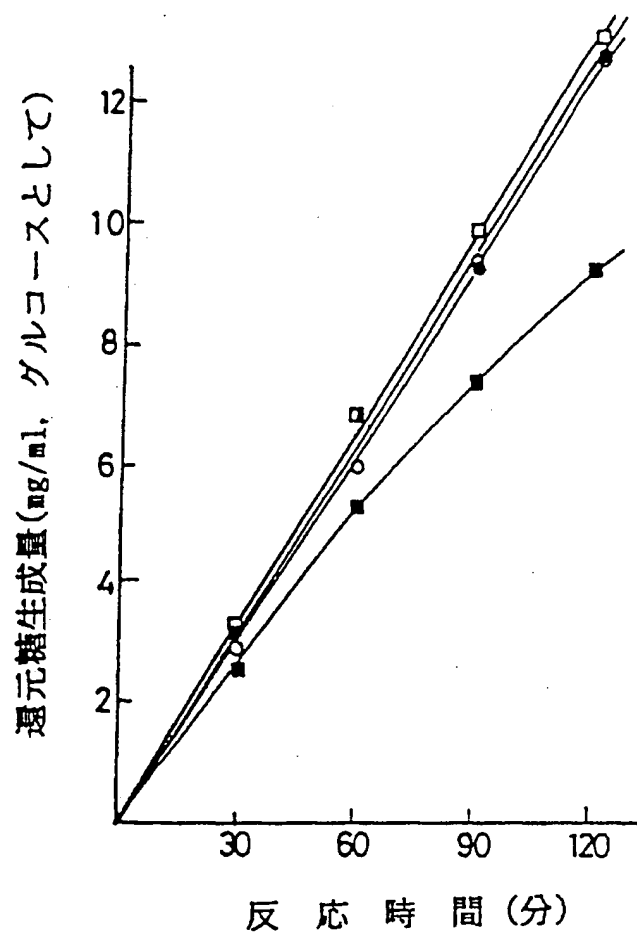
第 2 图



第 3 图



第 4 図



第5図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C15 C12N9/28, C12N1/20, C12P19/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C15 C12N9/28, C12N1/20, C12P19/14 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 38, No. 4, August, 1992 (08. 1992) F. JIN et. al. "Purification and characterization of a thermostable α -amylase from Bacillus sp-JF strain" P. 293-302	1, 5, 8, 9
X	Acta Microbiologica Sinica, Vol. 31, No. 4, (1991), Hu X et. al. "Studies on the screening of thermostable α -amylase-producing strains" P. 267-273	1-3, 5-6, 8, 9
A		4, 7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search March 8, 1994 (08. 03. 94)		Date of mailing of the international search report March 22, 1994 (22. 03. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁵ C12N9/28, C12N1/20, C12P19/14		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁵ C12N9/28, C12N1/20, C12P19/14		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Journal of General and Applied Microbiology, 第38巻, 第4号, (8月, 1992) F. JIN et al [Purification and characterization of a thermostable α -amylase from Bacillus sp-JF strain] p.293-302	1, 5, 8, 9
X	Acta Microbiologica Sinica, 第31巻, 第4号, (1991), Hu X et al [Studies on the	1-3, 5-6, 8, 9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
08.03.94		22.03.94
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	screening of thermostable α -amylase- producing strains] p.267-273	4, 7